

Electroporation에 의한 *Escherichia coli-Lactobacillus casei* 셔틀 벡터의 형질전환

홍 성 희*

미국국립보건원 암연구소

Lactobacillus casei ssp. *casei* NCIB 4114 균주로부터 3.5 kb의 플라스미드를 분리하여, 이 플라스미드를 함유하는 *Escherichia coli-Lactobacillus* 셔틀 벡터(shuttle vector)들을 만들었다. 셔틀 벡터들은 모두 electroporation에 의해 성공적으로 형질전환되었다. Electroporation의 최적 조건은 벡터 DNA 1 µg 당 2×10^5 형질전환체의 효율이었고, 이들 벡터의 성공적 도입은 이들 벡터의 유산균에서의 음식등급 벡터로의 사용 가능성을 제시하였다.

Key words □ electroporation, *Escherichia coli-Lactobacillus casei* shuttle vector, food-grade vector, transformation

서 론

여러 종류의 유산균들의 유전학 또는 분자생물학에 관한 연구가 최근에 많이 진행되어 왔다(4,6). 이러한 현상은 유산균이 여러 종류의 발효과정에 있어 산업적으로 매우 유용성이 있다는 것을 시사해준다. 최근 개발되고 있는 안전한 식품등급의 유산균주의 적절한 사용은 식품산업계에 큰 영향을 줄 것으로 전망되고 있다. 많은 유산균들은 하나 혹은 여러 개의 다양한 크기의 플라스미드를 함유하고 있다. 그러나 현재까지 단지 몇 개의 플라스미드가 분석되어졌을 뿐이다. 유산균의 유전자 조작은 다양한 셔틀 벡터를 통해 대장균에서 확립된 조작 기술의 영향으로 발전되어 가고 있다. 클로닝 벡터는 일반적으로 2 개 이상의 유전적 표식(marker)을 가지고 있는데, 이는 insertional inactivation에 의한 플라스미드 인식의 도구로 클로닝의 기회를 증가시켜 주는 요인이 된다. 아울러 멀티클로닝 사이트(multi-cloning site)의 도입 또한 클로닝 벡터로서의 편리성과 효율성을 증가시키는 요인이 된다.

Electroporation은 다른 형질전환 방법에 비해 여러 가지 장점을 가지고 있다(9). Electroporation은 그 조작과정에서 시간이 단축되며, 신뢰 할 수 있는 반복 가능성을 가지고 있다. 뿐만 아니라 적은 양을 사용할 수 있고, 가격이 저렴하다는 장점들을 가지고 있다. PEG(polyethylene glycol)에 의한 protoplast를 이용한 형질전환은 5-7 일이 걸리는 반면, electroporation에 의해서 유입된 DNA의 발현은 48시간 이내에 볼 수 있다(8).

이 논문은 *L. casei*의 플라스미드의 분리와 *E. coli-L. casei* 간의 셔틀 벡터의 조성, 이들 벡터의 식품등급 용도의 벡터로서의 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

L. casei ssp. *casei* NCIB 4114는 National Industrial Bacteria Collection(Aberdeen, Scotland)에서 습득하였다. LCMU는 *L. casei* ssp. *casei* NCIB 4114를 높은 온도에서 기른 후에 분리하였다. 플라스미드 pLC88은 *L. casei* ssp. *casei* NCIB 4114로부터 분리하였다. 플라스미드 pNZ123은 Dr. de Vos(4)로부터 친절하게 제공받았다. 이 논문에 사용된 플라스미드는 Table 1에 열거되었다. *Lactobacillus* 균주는 *Lactobacilli* MRS medium(Difco, Detroit, MI)로 32도에서, 대장균은 LB 배지로 37 도에서 키웠다

플라스미드 분리

대장균에서의 플라스미드는 alkaline lysis 방법을 사용하였다(7). *L. casei*에서 플라스미드는 Anderson과 McKay(1)의 방법을 약간 수정하여 분리하였다. 간략히 하면, 세포배양액 3 ml을 5,000×g에서 5분 원심분리 한 후, 세포외 탄수화물(exopolysaccharides)을 포함한 상등액을 피펫으로 세포가 같이 따라나오지 않게 조심스럽게 제거 한 후, 생리 식염수로 2 번, 그리고 lysis buffer(6.7% sucrose in 50 mM Tris/1 mM EDTA pH 8.0)로 1 번 세척하였다. 다음 세포 용액을 400 µl로 채운 후, 97 µl의 lysozyme 용액(10 mg lysozyme ml⁻¹, 25 ml Tris-HCl, pH 8.0)과 50 unit의 mutanolysin(N-acetylmuramidase) 용액을 넣어, 37도에서 1 시간 동안 처리하였다 이후 75.8 µl의 lysis 용액(27.5 µl의 20% SDS 와 48.2 µl의 0.25 M EDTA를 사용 직전에 혼합)을 넣은 후 20 분 간 처리하였고, 다음은 alkaline lysis의 방법을 따라서 했다.

플라스미드의 대량 분리는 Beckman LB-M 초고속원심분리기를 사용하여, cesium chloride/ethidium bromide density gradient 방법으로 하였다(7).

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 1-301-496-7642, Fax: 1-301-435-8036
E-mail: hongsg@mail.nih.gov

Electroporation

Electroporation은 Bio-Rad사의 Gene Pulser™를 이용하여 수행했다. 대장균은 Dower 등(3)의 방법으로 하였으며, *L. casei* 세포는 Chassy와 Flickinger(2)의 방법을 사용하였다. 적당량의 DNA를 세포와 섞은 후, single pulse electroporation(200 Ω resistance, 25 μF capacitance, 10,000에서 12,5000 V/cm)로 행한 후, 즉시 배양배지에 회석하였다

결과 및 고찰

***L. casei* ssp. *casei* NCIB 4114로 부터 플라스미드의 분리**

L. casei ssp. *casei* NCIB 4114는 세포의 탄수화물을 생산한다. 이 균주는 3.5 kb의 플라스미드를 가지고 있다. 세포의 탄수화물의 조짐스런 제거가 플라스미드 분리에서 대단히 중요하였다.

많은 세포의 탄수화물 생산 유산균들이 높은 온도에서 배양시, 세포의 탄수화물 생성성질을 잃어 버렸다 *L. casei* ssp. *casei* NCIB 4114도 고온 배양시 세포의 탄수화물 생성성질이 상실됨과 동시에 흥미롭게도 플라스미드도 잃어 버렸다. *L. casei* ssp. *casei* NCIB 4114에서 분리된 3.5 kb 플라스미드는 pLC88으로 명명되었고, NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GeneBank Database에 보고되었다(Accession number: U31333). 이 플라스미드를 가진 *L. casei* ssp. *casei* NCIB 4114는 현재 산업체에서 식품 발효에 유용하게 쓰이기 때문에 플라스미드는 식품등급 벡터의 좋은 후보가 된다. 세포의 탄수화물을 생산하지 않고, 플라스미드가 없는 LCMU가 형질 전환시에 속

Table 1. Plasmids used in this study

Plasmid	Genetic markers	description	Source or reference
pLC88			This study
pTZ19U	Ap ^R		Yanisch-Perron <i>et. al.</i> , (10)
pNZ123	Cm ^R		de Vos (4)
pBluescript SK II	Ap ^R		Stratagene (La Jolla, CA)
pTZKLC		<i>Kpn</i> I restricted pLC88 joined to pTZ19U; Ap ^R	This study
pBLHLC		<i>Hind</i> III restricted pLC88 joined to pBluescript SK II; Ap ^R	This study
pNZHX1		3.1 kb <i>Hind</i> III/ <i>Xba</i> I fragment of pLC88 in pNZ123 (<i>Hind</i> III/ <i>Xba</i> I); Cm ^R	This study
pNZSS1		2.56 kb <i>Sst</i> I/ <i>Sca</i> I fragment of pLC88 in pNZ123 (<i>Sst</i> I/ <i>Sca</i> I); Cm ^R	This study
pNZSS2		0.94 kb <i>Sst</i> I/ <i>Sca</i> I fragment of pLC88 in pNZ123 (<i>Sst</i> I/ <i>Sca</i> I); Cm ^R	This study
pNZSX1		2.3 kb <i>Sst</i> I/ <i>Xba</i> I fragment of pLC88 in pNZ123 (<i>Sac</i> I/ <i>Xba</i> I); Cm ^R	This study
pNZSX2		1.2 kb <i>Sst</i> I/ <i>Xba</i> I fragment of pLC88 in pNZ123 (<i>Sac</i> I/ <i>Xba</i> I); Cm ^R	This study

주세포로 사용되었다.

pLC88을 함유한 벡터들의 조성

플라스미드 pLC88은 항생제나 영양요구형(auxotrophic) 선택 표식(selective marker)을 가지고 있지 않다. 이 선택 표식을 pLC88에 도입할 목적으로 여러 조합 플라스미드(chimeric plasmids)가 만들어 졌다(Table 1). pLC88과 pTZ19U 또는 pBluescript로 만들어진 벡터들은 *E. coli* DH5 균주 속으로는 잘 형질 전환이 되었지만, 유산균인 LCMU로는 잘 되지 않았다. 유전자 표식을 가지고, 안정적으로 유산균 내에서 잘 발현 될 수 있는 벡터의 조성을 위해, *Staphylococcus aureus*의 리플리콘을 가진 플라스미드 pNZ123(4)와 pLC88가 조합된 벡터를 제조하였다(Table 1).

***L. casei*의 electroporation**

염화 칼슘을 처리한 competent cell에 의한 형질전환은 *L. casei*에서 성공하지 못 하였다.

Chassy와 Flickinger(2)는 *L. casei* ATCC 393 균주에 electroporation에 의한 형질전환에 성공하였다. 위의 균주로 25 μF, 5,000 V/cm으로 μg DNA당 104의 형질 전환체의 효율을 보였다. 이 조건에서 대략 50%의 세포가 살아 남았다. 그러나 같은 조건에서 pNZ123은 LCMU로 형질 전환되지 않았다. 최적 조건을 찾기 위한 실험을 한 결과, 6,000 V/cm에서 71%의 생존

Table 2. Transformation efficiency and % survivors of *L. casei* LCMU with pNZ123 at different field strengths with 1 μg of DNA

Field strength (V/cm)	% Survivors	Transformants/μg DNA
0	100	0
2,000	90	0
4,000	75	0
6,000	71	1.5×10 ²
8,000	32	1.4×10 ⁴
10,000	20	2.1×10 ⁵
12,000	18	4.8×10 ⁴

Table 3. Transformation efficiency of *L. casei* LCMU with pNZ123 with different DNA concentration

Amount of DNA	Transformants/μg DNA
10 ng	1.8×10 ⁴
100 ng	3.8×10 ⁴
1,000 ng	2.0×10 ⁵
10,000 ng	2.2×10 ⁴

Table 4. Transformation efficiency and % survivors of *L. casei* LCMU with chimeric vectors at field strength of 10,000 (V/cm)

Plasmid	% Survivors	Transformants/ μ g DNA
pNZ123	20	2.1×10^5
pTZKLC	21	2.4×10^4
pBLHLC	19	1.8×10^4
pNZHX1	22	4.8×10^4
pNZSS1	21	1.5×10^5
pNZSS2	22	1.4×10^5
pNZSX1	20	8.4×10^4
pNZSX2	21	4.2×10^4

율에 낮은 효율을 보였고, 10,000 V/cm의 경우, 생존율은 20% 이었지만, 형질전환 효율은 시험 조건들 가운데 가장 높았다. 상기한 조건(200 Ω resistance, 25 μ F capacitance, 10,000 V/cm)을 다른 실험에 사용한 결과 형질전환 효율은 벡터 DNA의 농도에 영향을 받았고, 이 중 1,000 ng/ml 때 최적이었다(Table 3). 플라스미드 pLC88과 pNZ123으로 만들어진 벡터들은 약간의 효율의 차이는 있었지만, 모두 대장균은 물론 LCMU 안으로 잘 형질 전환되었다(Table 4). 이상의 결과는 위의 벡터들이 식품등급의 벡터로서의 사용 가능성이 있음을 보여 주는 것이다.

현재 유전자 전달 방법을 잘 알 수 없는 균주에서 이 방법들을 개발하는 것은 하나의 도전이라 생각 할 수 있다. 흔한 방법들은 지금 다른 종에서 사용된 방법을 목표 균종에 어떻게 잘 적용시키는가 하는 것이다. 현재까지 개발된 유전자 조작 및 전달 방법을 식품용도의 유산균에서 적절하게 사용하는 것은 식품산업계에 지대한 영향을 미칠 것이다. 성공적인 형질 전환과 클로닝 벡터의 조성은 pLC88이 식품등급의 벡터 개발의 좋은 후보자가 될 가능성을 보여 주었다.

참고문헌

1. Anderson, D. G. and L. L. McKay. 1983. A simple and rapid

- method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 549-552.
2. Chassy, B.M. and J.S. Flickinger. 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 44, 173-177.
3. Dower W., J. Miller, and C. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-45
4. de Vos, V.M. 1992. Engineering of lactic acid bacteria for improved production of foods, flavors and additives, pp. 524-527. *In* Harnessing Biotechnology in the 21st Century. R. Lodisch and A. Bose (eds.). American Chemical Society.
5. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* 166, 577-580
6. Mercener, A., P.H. Pouwels, and B.M. Chassy. 1994. Genetic engineering of lactobacilli, leuconostocs and *Streptococcus thermophilus*, pp 252-293. *In* Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. M.J. Gasson and W. M. de Vos (eds.). Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK.
7. Sambrook J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
8. Simon, D., A. Rouaut, and M.C. Chopin. 1986. High-efficiency transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 394-395.
9. Trevors, J.T., B.M. Chassy, W.J. Dower, and H.P. Blaschek. 1992. Electrotransformation of bacteria by plasmid DNA, pp 265-290. *In* Guide to Electroporation and Electrofusion. D.C. Chang, B.M. Chassy, J.A. Saunders, and A. E. Sowers (ed.). San Diego, Academic Press.
10. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

(Received July 1, 2000/Accepted July 8, 2000)

ABSTRACT: Transformation of *Escherichia coli*-*Lactobacillus casei* Shuttle Vector by Electroporation

Sung Hee Hong*(Intervention Section, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892, U. S. A.)

A 3.5 kb plasmid from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* NCIB 4114 was isolated and *E. coli*-*L. casei* shuttle vectors were constructed containing this plasmid. Transformation by electroporation was successful with all the plasmids constructed. Optimized condition for the electroporation was established with efficiency level of 2×10^5 transformants per μ g of vector DNA. Successful introduction of those shuttle vectors enable to these vectors as food grade vector for lactic acid bacteria.